

# 1. 高病原性ウイルスの増殖機構の解明及びその創薬への応用

浦田 秀造

長崎大学感染症共同研究拠点/熱帯医学研究所

主にアフリカ地域で流行しているエボラウイルス病やラッサ熱、そして日本を含む東アジア地域で流行している重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) など、我々は多くの高病原性ウイルス感染症の脅威に曝されている。近年、これら感染症への注目度が高まり研究の進展は以前と比べて遥かに早まっている。その結果、抗ウイルス薬やワクチンの開発が進み、一部認可されているものも出てきている。しかし同時に、新たな高病原性ウイルスの出現も起きており、私たちはこれら高病原性ウイルスの細胞内複製機構を分子レベルで解明し、新たな創薬標的の検証そして有用な抗ウイルス化合物の同定を目指している。

## はじめに

昨今 SARS-CoV-2 感染による COVID-19 の世界的な感染拡大に見られるように我々人類は多くの新興・再興感染症の脅威に曝されている。同時に交通機関の発達により、これまでは局地的な感染に留まっていた感染症が瞬く間に世界中に広がることも再認識された。我々は主にアフリカ地域で散発的な感染が確認されるエボラウイルス・マールブルグウイルス等のフィロウイルス、西アフリカ地域で流行しているラッサウイルス (LASV) や南米出血熱の原因となるフニンウイルス等のアレナウイルス、そして2011年に中国で初めて報告され我が国でも2013年以降毎年患者が報告されている重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) 等<sup>1)</sup>、ヒトに対して高病原性かつ治療法が確立されていない多岐に渡るウイルスの細胞内複製機構の解明そして新規抗ウイルス療法の確立を目指し研究を進めてきた (図1)。本稿では我々が主に研究対象としている各ウイルスの基本的な特徴を概説した後、我々の研究成果を交えてこれらのウイルスの細胞内複製機構、特に粒子形成機

構更にはこれらに対する抗ウイルス薬やワクチンの開発の現状について紹介する。

## 一本鎖マイナス (ネガティブ) 鎖 RNA ウイルスの特徴

我々が研究対象としているウイルスは全てゲノムとしてマイナス鎖 [ ウイルスタンパク質の翻訳のためにはウイルスゲノムからプラス (ポジティブ) 鎖の RNA を生成するために一度転写を必要とする ] を保有する。フィロウイルス科はこのマイナス鎖ウイルスゲノムを一種類、アレナウイルス科は二種類、フェニエウイルス科は三種類保有する (図2・3)。最新のウイルス分類において (表1)<sup>2)</sup>、アレナウイルス科にもゲノムを三種類保有するものが報告されているが<sup>3-5)</sup>、本稿ではヒトへの病原性が報告されているウイルスに限定し、二種類のみを概説対象とする。フィロウイルス科・アレナウイルス科・フェニエウイルス科の複製は基本的に細胞質に限定されている。これらのウイルスは宿主細胞の脂質二重膜 (エンベロープ) を被り細胞外へ放出されるため、エンベロープウイルスにも区分される (図4)<sup>6)</sup>。

## フィロウイルス科

エボラウイルス・マールブルグウイルスは国際ウイルス分類委員会 (ICTV) でモノネガウイルス目フィロウイルス科に分類され、フィロウイルス科は更にエボラウイルス属やマールブルグウイルス属など6つの属を含む (表1)。エボラウイルス・マールブルグウイルスはゲノムに7つのウイルスタンパク質をコードする (図3A)。エボラウイルスの場合、GPはGP1/2のみならずsGP、ssGP、そし

## 連絡先

〒852-8523

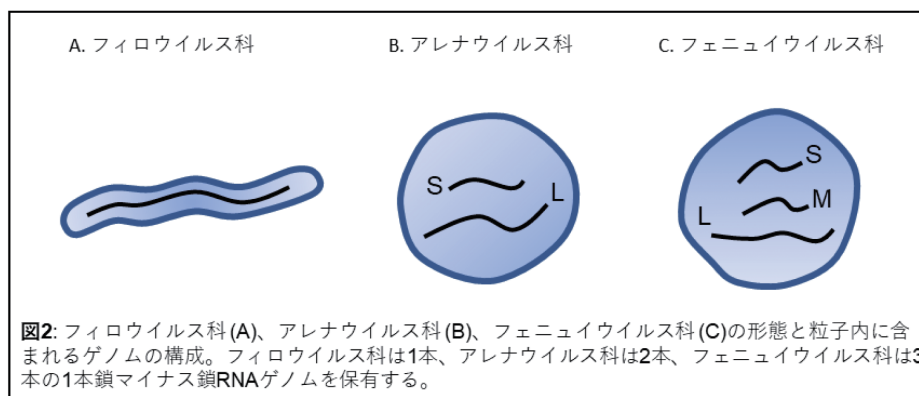
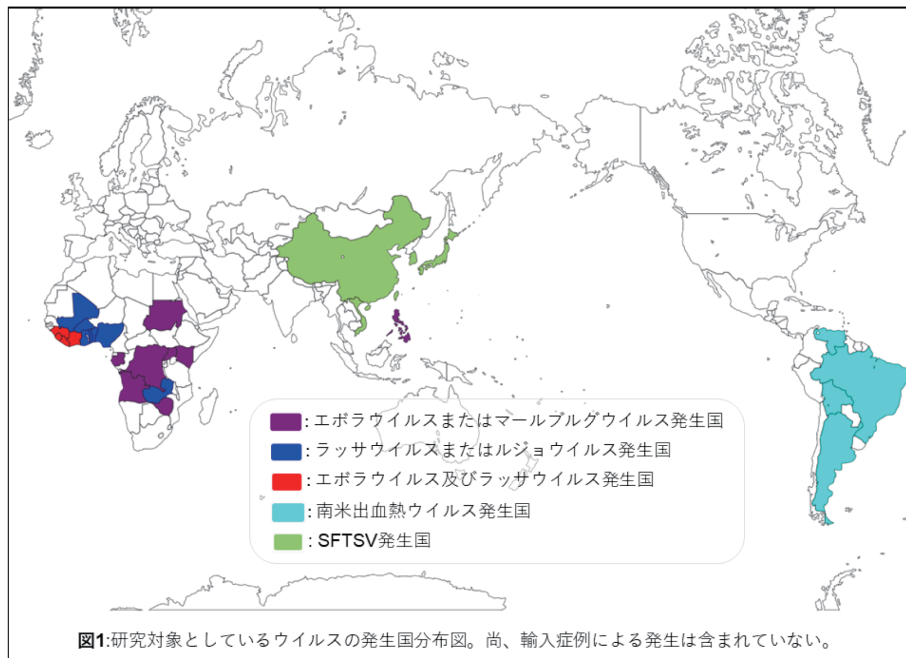
長崎県長崎市坂本1-12-4

長崎大学感染症共同研究拠点 人材育成部門

TEL: 095-819-7970

FAX: 095-819-7970

E-mail: shuzourata@nagasaki-u.ac.jp



て delta peptide もコードし、それぞれウイルス感染に重要な役割を果たすことが知られている<sup>7)</sup>。ウイルスの細胞侵入には GP1/2 が、細胞質内のゲノム複製には NP, VP30, VP35, L が、そして粒子形成には VP40 と VP24 が重要な役割を果たす。ウイルス粒子の形成は主に細胞膜直下で起こり、細胞膜で出芽し、感染性粒子が放出される (図 4)。

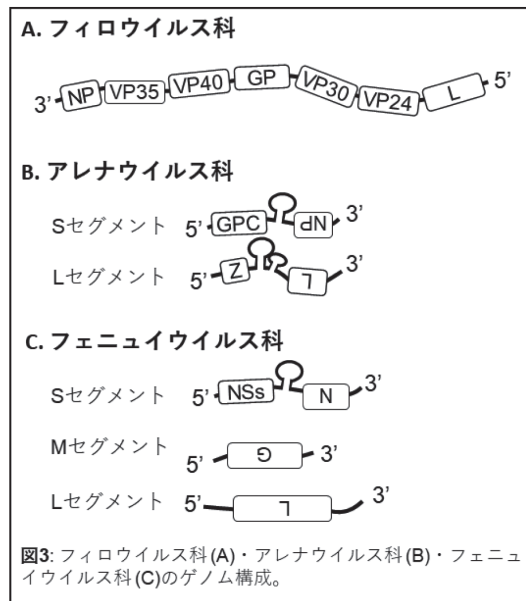
### アレナウイルス科

アレナウイルスはヒト感染において高病原性を示すものから無症候性のものを含む。最近のゲノム解析からヘビの封入体病の原因となるアレナウイルスが発見されたことを受け、哺乳類に感染するアレナウイルスを *Mammarenavirus* 属、爬虫類に感染するアレナウイルスを *Reptarenavirus* 属に分類し、この他にも2つの属を含め合計4つのウイルス属がアレナウイルス科には含まれる (表 1)。本稿ではヒトに感染するアレナウイルスを対象に解説する。

*Mammarenavirus* は系統学的、地理的、血清学的に Old World (OW) アレナウイルスと New World (NW) アレナウイルスに分類され、前者には LASV, リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV), ルジヨウイルス等が含まれ、後者には南米出血熱を引き起こすフニンウイルス等が含まれる。NW アレナウイルスは更に clade A から C そして A/B もしくは D の4つに分類される<sup>8)</sup>。これら *Mammarenavirus* は S セグメント, L セグメントの2種類のウイルスゲノムを保有する (図 3B)。それぞれのセグメントは2種類のウイルスタンパク質を IGR (Intergenic region) を挟んで逆向きにコード (アンピセンス) することがアレナウイルスの一つの特徴である。S セグメントは NP と GPC, L セグメントは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) とウイルスマトリックスタンパク質 (Z) をコードする。ウイルスの細胞侵入には GPC が開裂して形成される SSP/GP1/GP2 の三量体が関与し、細胞質におけるウ

Realm	Kingdom	Phylum	Subphylum	Class	Order	Family	Genus	Species	通称
界	界	門	亜門	類	目	科	属	種	
Riboviria	(Orthomavirae)	Negarnaviricota	Haploviricotina	Monjiviricetes	Mononegavirales	Filoviridae	Cuevavirus		
							Dianlovirus		
							Ebolavirus	Bombali ebolavirus	
								Bundibugyo ebolavirus	
								Reston ebolavirus	
								Sudan ebolavirus	
								Tai Forest ebolavirus	
								Zaire ebolavirus	
							Marburgvirus	Marburg marburgvirus	
			Striavirus						
			Thamnovirus						
			Polyploviricotina	Ellioviricetes	Bunyavirales	Arenaviridae	Mammarenavirus	Argentinian mammarenavirus	Junin virus
								Brazilian mammarenavirus	Sabia virus
								Chapare mammarenavirus	Chapare virus
								Guanarito mammarenavirus	Guanarito virus
								Lassa mammarenavirus	Lassa virus
								Lujo mammarenavirus	Lujo virus
								Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus	LCMV
Machupo mammarenavirus	Machupo virus								
Reptarenavirus									
Phenuiviridae	Bandavirus	Dabie bandavirus	SFTSV						

表1: 研究対象としているウイルスの2020年時点での国際ウイルス分類委員会による分類。

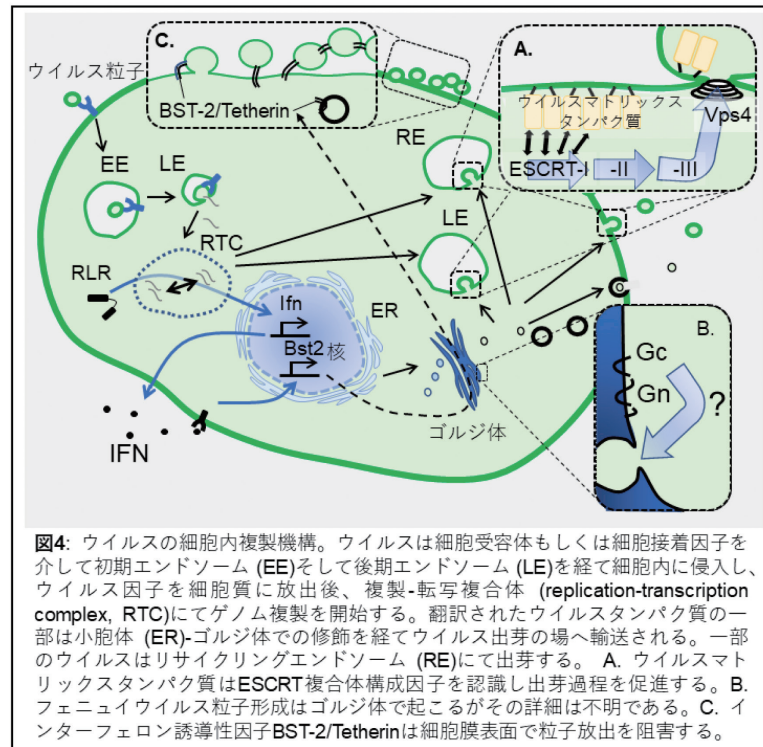


ウイルスゲノム複製にはNPとLが<sup>9)</sup>、そしてウイルスの粒子形成にはZが中心的な役割を果たす。ウイルス粒子の形成は主に細胞膜直下で起こり、細胞膜で出芽し感染性粒子が放出される(図4)<sup>10)</sup>。

**フェニウウイルス科**

ICTVの最新の分類によると、かつてSFTSVと呼ばれ

ていたウイルスの名称は現在 *Dabie bandavirus* とされているが、本稿では便宜上 SFTSV で通させていただきます。SFTSVはSセグメント、Mセグメント、Lセグメントの3種類のゲノムを粒子内に保有する。SセグメントはNタンパク質及びNSsをアンビセンス鎖で、Mセグメントは表面糖タンパク質前駆体(G), LセグメントはRNA依存性RNAポリメラーゼ(L)をそれぞれコードしている(図



3C). Gの開裂によって生成されるSP/Gn/Gcが細胞への侵入に重要で、ゲノム複製にはN及びLが重要な役割を担う。NSsは自然免疫反応に対して拮抗作用を保有する。ウイルスゲノム複製は細胞質で行われるが、粒子形成はクリミア・コンゴ出血熱ウイルスやリフトバレー熱ウイルスなどと同様にゴルジ体膜直下で起こり、粒子はゴルジ体内に放出され、細胞膜まで輸送後細胞外に放出される (図4)。

#### フィロ・アレナ・フェニキュウウイルスの細胞侵入及び ウイルスゲノム複製機構

我々が研究対象としているウイルスたちは基本的に全て細胞質で複製する (図4)<sup>11)</sup>。ウイルスは標的細胞の特定の接着因子や受容体を認識後、エンドソーム内の低pH条件下で膜融合を起こし、ウイルスに内包されたウイルス因子を細胞質に放出する<sup>12)</sup>。その後、細胞質でゲノム複製・転写が起こり、翻訳されたウイルスタンパク質はウイルスゲノムとともに粒子を形成する細胞膜直下 (細胞表面膜、後期エンドソーム膜、ゴルジ体膜、小胞体膜やリサイクリングエンドソーム膜<sup>13)</sup>、等)まで輸送され、出芽を誘導し感染性粒子を形成、そして細胞外へ放出される。

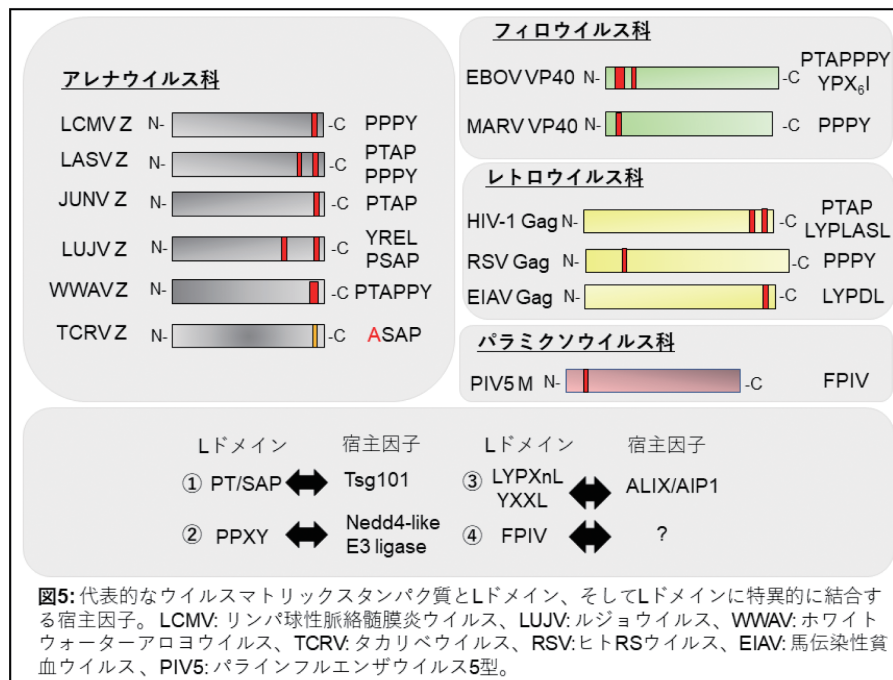
フィロウイルスではDC-SIGN、C型レクチンの他、TIM-1などが細胞接着因子として知られており<sup>14-22)</sup>、マクロピノサイトーシスにて細胞内に侵入<sup>23,24)</sup>後、エボラウイルスGPはエンドソーム内の受容体NPC1を認識し膜融合を起こす<sup>25,26)</sup>。この際TIM-1とNPC1の相互作用がGPによる膜融合に重要であるとされる<sup>27)</sup>。TIM-1に関し

ては、通常は細胞膜の細胞質側に露出しているphosphatidyl serine (PS)との相互作用が重要であり、PSの膜外露出にはXkr8 (スクランブラーゼ)が関わっている<sup>1)</sup>。また、エボラウイルスの細胞侵入に関してはTPC1の関与も報告されている<sup>28)</sup>。

アレナウイルスの場合、OWアレナウイルス及びclade Cに分類されるNWアレナウイルスは $\alpha$ -ジストログリカンを受容体として<sup>29,30)</sup>、ヒト病原性のNWアレナウイルスはhuman Transferrin receptor 1 (hTfR1)を受容体として利用する<sup>31)</sup>。LASVにおいてはエンドソーム内のLAMP1を第二受容体として利用する<sup>32)</sup>。また、例外としてルジョウイルスはNRP2及びCD63を<sup>33)</sup>、ヒト非病原性NWアレナウイルスは上記以外の受容体を細胞侵入に利用する。OWアレナウイルスはクラスリン・ダイナミン非依存的に、NWアレナウイルスはクラスリン・ダイナミン依存的に細胞内に侵入し、共にエンドソーム内で膜融合を起こす<sup>34,35)</sup>。

SFTSVにおいては、細胞接着因子・受容体としてはDC-SIGNやNonmuscle Myosin Heavy Chain IIAが報告されている<sup>36,37)</sup>。ウイルス粒子はクラスリン依存的に細胞内に侵入し、エンドソームで膜融合を起こす<sup>38,39)</sup>。

細胞質に細胞因子を放出した各ウイルスはウイルスゲノム複製・転写及びタンパク質翻訳過程に移行する。この際、ウイルスはRIG-I-like receptor (RLR)等の自然免疫認識機構から逃れ、効率よく複製するためにウイルス固有のウイルスゲノム複製の“場”を構築する場合がある



(Replication-Transcription complex RTC, 参照; エボラウイルス<sup>40)</sup>, フニンウイルス<sup>41)</sup>). このRTCはウイルス毎によって構成する因子や特性は異なると推測される. 近年だと, パラミクソウイルス科の麻疹ウイルスなどでこの複合体は膜構造によらない液-液相分離であることも示唆されているが<sup>42)</sup>, その実態や詳細な構成因子の解明は今後の研究が期待される. 我々はSFTSVの細胞内複製には脂質合成が関与していることを示してきたが<sup>43)</sup>, その詳細は今後明らかとしていきたい. 生成されたウイルスゲノムとウイルスタンパク質は粒子形成の場に集合後, ウイルス粒子を形成する.

### フィロ・アレナウイルスのウイルスマトリックスタンパク質による粒子形成機構

エボラウイルス・マールブルグウイルスなどのフィロウイルス科にはVP40<sup>44-46)</sup>, LASV・LCMV・ルジヨウイルスなどのアレナウイルス科にはZなどに代表されるウイルスマトリックスタンパク質が存在する(図5)<sup>8,10)</sup>. ウイルスマトリックスタンパク質は高病原性ウイルスに加え, ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)やヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)などのレトロウイルスでのGag<sup>47-49)</sup>, 麻疹ウイルスなどのパラミクソウイルスでのMタンパク質がこれに相当し<sup>50)</sup>, 単独の細胞内発現でウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)を産生する. これらのウイルスマトリックスタンパク質にはlateドメイン(Lドメイン)と呼ばれる短いアミノ酸モチーフが存在し, 特定の宿主因子と結合することで出芽・粒子産生を促進させ

る. LドメインはPT/SAP, PPXY, LPXnL (YXXL)が主に知られており, それぞれTsg101, E3リガーゼ, Alix/AIP1と結合する. 第4のLドメインとしてFPIVが知られているが, その結合パートナーは不明である(図5)<sup>51)</sup>. Tsg101及びAlix/AIP1はESCRT機構と呼ばれる宿主細胞の膜切断機構を構成する因子であり, ウイルスマトリックスタンパク質はこの宿主機構を利用する形で出芽を誘導し, 最終的に膜切断を引き起こし, 粒子を感染細胞から放出させる(図4A). E3リガーゼはESCRT機構の認識に関わるとの報告もあるが, その詳細は明らかとされていない<sup>52,53)</sup>. ESCRT機構を利用したウイルス出芽は上記のマイナス鎖RNAウイルスのみならず, デングウイルス・日本脳炎ウイルスなどのプラス鎖RNAウイルスでも報告されており, 小胞体膜上でESCRT機構を利用してウイルスの出芽が行われる<sup>54)</sup>. ESCRT機構は元々, 細胞表面膜上の不要になった受容体の分解経路におけるmulti-vesicular body (MVB)経路の最終ステップとして細胞生物学的研究が進められてきたが<sup>55)</sup>, 2001年にHIV-1の研究によりウイルスの出芽がESCRT機構を利用していることが報告され<sup>56,57)</sup>, この分野の分子機構の解明が一気に進んだ. その後このESCRT機構がMVB経路, ウイルス出芽のみならず, 細胞分裂<sup>58)</sup>, 核膜修復<sup>59,60)</sup>, 細胞膜傷害時の修復<sup>61)</sup>, オートファジー膜の形成<sup>62)</sup>等, 多くの細胞機構に関わることが明らかとされてきた<sup>63)</sup>.

エボラウイルスのVP40はN末端にPTAPとPPPYの二つのLドメインが重なりコードされている. これらのLドメインはウイルス増殖に必須ではないものの<sup>64)</sup>, VP40

による出芽に重要であることが示されている<sup>65-67)</sup>。PTAP には Tsg101<sup>68)</sup>、PPPY には Nedd4.1, ITCH や BUL1 などの E3 リガーゼが結合し<sup>69-71)</sup>、粒子の産生を促進する。PTAPPPY の後に続く YPXnL 配列も Alix/AIP1 との結合を通して粒子産生に関与することが示唆されている<sup>72)</sup>。一方、その重要性は明らかではない<sup>73)</sup>。VP40 はこの他にも二量体形成に重要であるアミノ酸や<sup>74-76)</sup>、細胞膜認識のための C 末端アミノ酸配列<sup>77-79)</sup>、そしてその他の宿主因子との結合に重要な配列が報告されている<sup>80-82)</sup>。我々はエボラウイルス VP40 の C 末端側にコードされている YIGL 配列が、粒子産生及びゲノム複製の適切な制御に関わることを報告した<sup>83)</sup>。VP40 の構造情報を元にインシリコ解析を行った結果、YIGL 配列に三次構造上近接する N 末側の複数のアミノ酸配列が YIGL 配列との静電気相互作用により安定化され粒子産生に関与することを見出した<sup>83)</sup>。

一方、マールブルグウイルスの VP40 はエボラウイルスとは異なり、PTAPPPY ではなく PPPY のみ L ドメインとして保有している (図 5)。我々はこのマールブルグウイルス VP40 の PPPY 配列が粒子産生に重要であること、Nedd4.1 及び Tsg101 が PPPY 配列を通して VP40 に結合し粒子産生を制御していることを報告した<sup>84,85)</sup>。この PPPY 配列の Nedd4.1 認識パターンはエボラウイルス VP40 の PPPY と異なる<sup>85)</sup>。

アレナウイルスは Z タンパク質がウイルスマトリックスタンパク質として機能することは述べた。Z タンパク質が欠損してもウイルスは増殖するが<sup>86)</sup>、増殖効率が著しく低いことから Z はウイルス複製及び効率的な粒子産生に必須であると考えられる。Z タンパク質の L ドメインは OW アレナウイルスと NW アレナウイルスで異なる<sup>8)</sup>。いくつかの例外を除いて NW アレナウイルスの Z は PT/SAP 配列のみを保有する。一つの例外がタカリベウイルスで、タカリベウイルスの Z タンパク質は PTAP 様配列「ASAP」をコードする。この ASAP 配列は 293T 細胞において粒子産生には関与しない<sup>87,88)</sup>。一方 OW アレナウイルスの L ドメインは少し多岐に渡る。LASV の Z タンパク質は PTAP そして PPPY 配列が C 末端にコードされている。それぞれの L ドメインは VLP 産生に重要であり、またそれらと相互作用する Tsg101 などの ESCRT 機構関連宿主因子も VLP 産生に関わることが分かっている<sup>89,90)</sup>。LCMV は PTAP 様配列「STAP」そして PPPY 配列がコードされている。ルジョウイルスの Z タンパク質は PTAP 配列の他、YREL 配列を保有しており、両者ともウイルス様粒子産生に重要である<sup>91)</sup>。

これらフィロ・アレナウイルスのウイルスマトリックスタンパク質による粒子産生は細胞内シグナル伝達経路や翻訳後修飾などにより制御されていることも知られている。

例えば、LASV の Z タンパク質による粒子産生には PI3K/Akt 経路が<sup>92)</sup>、エボラウイルス VP40 のタンパク質安定性や粒子産生にはそれぞれ SUMO<sup>93)</sup> や ISG15<sup>1)</sup> のユビキチン様タンパク質による修飾が関与している。

### フィロ・アレナウイルスの感染性粒子産生機構

感染性ウイルス粒子の産生においてウイルスマトリックスタンパク質は中心的な役割を果たすが、粒子が感染性を保有するには粒子内にその他のウイルスタンパク質やウイルスゲノム等を内包する必要がある。時に、これらウイルスマトリックスタンパク質以外のウイルスタンパク質がウイルスマトリックスタンパク質による粒子産生を促進する場合がある。例えば、エボラやマールブルグウイルスでは NP や GP の発現が VP40 による粒子産生を促進させる<sup>84,94)</sup>。マールブルグウイルス NP に関しては NP が保有する PTAP 配列が Tsg101 との相互作用を介して粒子産生を促進する<sup>95)</sup>。LASV やフニンウイルスにおいては GPC や NP の共発現はウイルス粒子の産生量自体には関与しないのに対し<sup>88,96)</sup>、タカリベウイルスは NP が Z による粒子産生を促進し、Z が保有する YXXL 配列や PTAP 配列がこの NP による粒子産生促進に関与している<sup>88)</sup>。

我々はアレナウイルスの GPC が適切に開裂することで初めて粒子内に取り込まれること、同時にこの開裂が抗アレナウイルス化合物の標的となり得ることを報告してきた<sup>91,97)</sup>。アレナウイルスの GPC は翻訳後、小胞体・ゴルジ体で宿主酵素 site 1 protease (S1P)/SKI-I によって開裂され GP1/GP2 となる。我々は、S1P による GPC 開裂は、GPC の細胞膜までの輸送には関係ないが、ウイルス粒子内への取り込みに必須であることを報告してきた<sup>91,97,98)</sup>。そして S1P 特異的阻害低分子化合物である PF-429242 がアレナウイルスの GPC の開裂を阻害し、感染性ウイルスの複製も阻害することを報告してきた<sup>91,97)</sup>。

### フェニウウイルスの感染性粒子産生機構

SFTSV はマトリックスタンパク質を保有しない (図 3C)。ウイルス膜タンパク質である G の開裂によって生成される Gn/Gc の単独発現もしくは N との共発現によってウイルス様粒子が産生される<sup>99-101)</sup>が、その詳細な分子機構はほとんど明らかとされていない (図 4B)。

### ウイルスと宿主の攻防

宿主は病原体に感染するとウイルスゲノムなどの病原体特異的因子を認識し、種々の自然免疫機構を活性化させる。対して病原体は自然免疫機構の活性化を阻止すべく、病原体特異的な抗自然免疫活性化機構を有する場合がある。例えば、フィロウイルスでは VP35<sup>102-104)</sup> や VP24<sup>105-107)</sup> が、アレナウイルスでは NP<sup>108-117)</sup> と Z<sup>118,119)</sup> が自然免疫の活性化を阻害する機能を保有する。SFTSV においては、NSs

に起因する複合体が i) IRF3 などのインターフェロン産生に関わる転写因子を隔離することでインターフェロン産生を抑制<sup>120)</sup>, ii) STAT1/2 を隔離することで STAT1/2 のリン酸化を阻害し, 結果インターフェロン刺激によるインターフェロン誘導性因子 (ISG) の発現誘導を抑制する. そしてこの NSs の STAT2 への結合に伴う STAT2 リン酸化阻害は動物種依存的であることが分かっている<sup>121)</sup>.

ISG の一つである抗ウイルス因子 BST-2/Tetherin は, HIV-1 研究において初めに報告された<sup>122)</sup>. その後, 複数のグループから BST-2 の抗ウイルス活性は HIV-1 のみならず多くのエンベロープウイルスに対して保持されていることが示された<sup>123)</sup>. BST-2 は感染細胞から粒子が放出される際, ウイルスのエンベロープ膜と宿主の細胞膜が切断される最終段階で両膜を繋ぎとめる形で粒子放出を阻害する (図 4C)<sup>124,125)</sup>. 対してウイルスも BST-2 特異的拮抗作用を保有するものがある. HIV-1 の Vpu<sup>122)</sup> やエボラウイルスの GP<sup>126,127)</sup> はその代表例であり<sup>128,129)</sup>, 最近我々はフニンウイルスの NP に抗 BST-2/Tetherin 作用があることを報告した<sup>130)</sup>. 加えて我々は, BST-2 が LCMV のマウス持続感染においてウイルスを脾臓内の辺縁帯に留め, ウイルス特異的 CD8 (+) T 細胞及び CD4 (+) T 細胞の機能を効率的に発揮させることでウイルスの排除に重要な役割があることを明らかとし, マウス個体でのウイルス感染制御においても重要な役割を果たすことを報告している<sup>131)</sup>.

### 高病原性ウイルスに対する ワクチン・抗ウイルス薬の現状

数年前までこれら高病原性ウイルスに対する認可されたワクチンや抗ウイルス薬はなかった. しかし, 2013 年末に始まった西アフリカ地域におけるエボラウイルスのアウトブレイクそして先進国への輸入感染例をきっかけに, これまで臨床試験が行われなかったワクチン候補や抗ウイルス薬候補の臨床試験が大きく前進した. ワクチンは人類が手にした病原体に対抗する最も強力な武器の一つであるが, 特にエボラウイルスに対するワクチンとしてはエボラウイルス GP を組み込んだ組換え水泡性口炎ウイルス (VSV) (Ervebo, メルク社) が 2019 年末に認可され<sup>132)</sup>, 続けてアデノウイルス及びワクシニアウイルスにエボラウイルス GP を組みこんだ組換えウイルス (Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo) も認可待ちである<sup>133)</sup>. その他にエボラウイルス ΔVP30<sup>134)</sup> も臨床第 I 相試験を開始している. 一方, 抗ウイルス薬においては ZMapp などの抗体カクテルに加えアビガン (ファビピラビル) が有効であることが確認されている. 特に, 体内ウイルス量が一定量以下の患者に対して高い有効性があるとされる. レムデシビルもエボラウイルス患者に対して一定の効果があるものと考えられる. 薬剤耐性ウイルス出現の可能性や副作用の軽減を考慮すると, エイズに対する HAART 療法と同様に, 複数の異なる

ウイルス増殖過程を標的とした抗ウイルス薬の混合使用が有効であると考えられる. エボラウイルスの細胞侵入阻害剤としては中和抗体の他, 低分子化合物の探索が行われている. ヒトモノクローナル抗体の分離そして標的となる GP との共結晶による構造解析から明らかとされる分子レベルの情報を元にした有効なウイルス細胞侵入阻害薬の開発が期待される. 上記のアビガンやレムデシビル同様に細胞質内におけるウイルスゲノムの転写・複製も有効な抗ウイルス標的となる. また, インフルエンザウイルスと同様にウイルスゲノム転写開始時のキャップスナッチング機構も有効な抗ウイルス標的となる<sup>135,136)</sup>. 最後に, 本稿で特に注力して記載したウイルス粒子産生過程も有効な抗ウイルス標的であり, 複数の抗ウイルス化合物は報告されているものの, 臨床試験そして実際に認可に至る化合物はまだない. 我々の研究が臨床で使用可能な化合物の開発に貢献できるように, これからも研究を進めていきたい.

### 今後の展開

一種病原体等に分類される高病原性ウイルスの感染性ウイルスを扱う研究は長い間, 日本において行うことができなかった. これらの研究には感染性のないウイルスタンパク質や核酸を扱ったり, また感染性ウイルスを扱うため海外の BSL-4 施設を扱う必要があった. BSL-4 施設での研究には長期のトレーニングを要し, 必ずしも簡便にアクセス・実験することはできなかった. しかし, 2015 年に国立感染症研究所の BSL-4 施設が運用を開始し, 一種病原体等の取扱いも開始された. 並行して長崎大学も BSL-4 施設の建築を進めており, 今後, 日本における感染症研究の更なる発展が期待される.

### 終わりに

約 20 年前の北海道大学薬学部 4 年時, 1 つ下の学年の学生とともに神経科学分野 (鈴木利治教授) の研究室で優秀な先輩方に囲まれて研究のイロハを教わり, アルツハイマー病を研究対象として私の研究者生活は始まった. その後, 長い研究者人生を考えた時, もっと魅力的な研究テーマは何だろう, と思案した結果辿り着いた結論が「ウイルス研究」だった. そこで, HIV-1 の研究をすべく同大学の遺伝子病制御研究所 (遺制研) への進学を決意した. この決意には黒崎陽平先生の御助言が大きな役割を果たし, またその決意の結果, 生涯の恩師である安田二期先生にも会うことができた. 医学修士学生として受けた有川二郎先生の講義が印象的だった. 安田先生の科学警察研究所への転出とともに, 直接の指導を仰ぐため千葉県に移り住み, 3 年間ほぼマンツーマンでご指導いただいたのは幸運だった. 安田先生には研究のみならず人脈を広げる機会をたくさん頂いた. 国立感染症研究所の森川茂先生もその一人で, 先生からは多くの試料や情報を提供していただいた. 博士

課程修了とともに柳雄介先生の後押しもいただき、米国スクリプス研究所の Juan C. de la Torre 先生の下でポストドクとして働く機会を得、計3年間で多くのことを学ばせていただいた。スクリプス研究所で出会った研究者や経験は今でも大切な宝物である。その後、安田先生の長崎大学熱帯医学研究所への栄転とともに帰国し、再び安田先生・黒崎先生とともに研究を行うことができた。安田先生のグループは今では15-20人の大所帯となったが、科学警察研究所での4人程度の小グループ時、熱帯医学研究所でのスタートアップ時の5人程度の小グループ時代が懐かしく思い出される。2020年1月より同大学感染症共同研究拠点人材育成部門の独立准教授として新たなステージに舞台を移したが、この受賞を糧に今後新たな研究を展開し、杉浦奨励賞受賞者として恥じない研究を行うとともにウイルス学会の益々の発展に貢献していきたいと考えていく所存である。

### 謝辞

本研究の大部分は元科学警察研究所第一部生物第五研究室室長・長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野教授及び感染症共同研究拠点準備室長である安田二郎先生の御指導のもとで行われ得られた研究成果です。これらは安田教授を始め、黒崎陽平先生の多大なご協力・サポートのもとに行われたもので、改めてここに御礼を申し上げます。またこの間、研究室の運営に携わってきた方々にも御礼を申し上げます。最後に、名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞にご推薦していただきました北海道大学医学研究科の有川二郎先生、九州大学医学研究院の柳雄介先生、国立感染症研究所の森川茂先生に深謝いたします。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

### 引用文献

- 1) Abraham, J. *et al.* Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathog* **5**, e1000358, doi:10.1371/journal.ppat.1000358 (2009).
- 2) International Committee on Taxonomy of Viruses Executive, C. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat Microbiol* **5**, 668-674, doi:10.1038/s41564-020-0709-x (2020).
- 3) Pontremoli, C., Forni, D. & Sironi, M. Arenavirus genomics: novel insights into viral diversity, origin, and evolution. *Curr Opin Virol* **34**, 18-28, doi:10.1016/j.coviro.2018.11.001 (2019).
- 4) Shi, M. *et al.* The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556**, 197-202, doi:10.1038/s41586-018-0012-7 (2018).
- 5) Shi, M. *et al.* Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* **540**, 539-543, doi:10.1038/nature20167 (2016).
- 6) Hunter, E. Virus Assembly. *Fields Virology* **1**, 127-152 (2013).
- 7) Feldmann, H., vSanchez A., Geisbert T.W. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. *Fields Virology* **1**, 923-956 (2013).
- 8) Urata, S. & Yasuda, J. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses* **4**, 2049-2079, doi:10.3390/v4102049v4102049 [pii] (2012).
- 9) Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. & de La Torre, J. C. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *Journal of virology* **74**, 3470-3477 (2000).
- 10) Urata, S. & de la Torre, J. C. Arenavirus budding. *Adv Virol* **2011**, 180326, doi:10.1155/2011/180326 (2011).
- 11) Nanbo, A., Watanabe, S., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells. *Scientific reports* **3**, 1206, doi:10.1038/srep01206 (2013).
- 12) Tani, H. *et al.* Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* **88**, 7317-7330, doi:10.1128/JVI.00512-14 (2014).
- 13) Nanbo, A. & Ohba, Y. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway. *J Infect Dis* **218**, S388-S396, doi:10.1093/infdis/jiy460 (2018).
- 14) Takada, A. *et al.* Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of virology* **78**, 2943-2947 (2004).
- 15) Takada, A. Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Front Microbiol* **3**, 34, doi:10.3389/fmicb.2012.00034 (2012).
- 16) Shimajima, M. *et al.* Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *Journal of virology* **80**, 10109-10116, doi:10.1128/JVI.01157-06 (2006).
- 17) Matsuno, K. *et al.* C-type lectins do not act as functional receptors for filovirus entry into cells. *Biochem Biophys Res Commun* **403**, 144-148, doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.136 (2010).
- 18) Simmons, G. *et al.* DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* **305**, 115-123, doi:10.1006/viro.2002.1730 (2003).
- 19) Kondratowicz, A. S. *et al.* T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8426-8431, doi:10.1073/pnas.1019030108 (2011).
- 20) Jemielity, S. *et al.* TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog* **9**, e1003232, doi:10.1371/journal.ppat.1003232 (2013).
- 21) Moller-Tank, S., Kondratowicz, A. S., Davey, R. A., Rennert, P. D. & Maury, W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. *Jour-*



- Journal of virology* **87**, 8327-8341, doi:10.1128/JVI.01025-13 (2013).
- 22) Morizono, K. & Chen, I. S. Role of phosphatidylserine receptors in enveloped virus infection. *Journal of virology* **88**, 4275-4290, doi:10.1128/JVI.03287-13 (2014).
  - 23) Nanbo, A. *et al.* Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* **6**, e1001121, doi:10.1371/journal.ppat.1001121 (2010).
  - 24) Saeed, M. F., Kolokoltsov, A. A., Albrecht, T. & Davey, R. A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog* **6**, e1001110, doi:10.1371/journal.ppat.1001110 (2010).
  - 25) Carette, J. E. *et al.* Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**, 340-343, doi:10.1038/nature10348 (2011).
  - 26) Cote, M. *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **477**, 344-348, doi:10.1038/nature10380 (2011).
  - 27) Kuroda, M. *et al.* Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for Cellular Entry of Ebola Virus. *Journal of virology* **89**, 6481-6493, doi:10.1128/JVI.03156-14 (2015).
  - 28) Sakurai, Y. *et al.* Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* **347**, 995-998, doi:10.1126/science.1258758 (2015).
  - 29) Cao, W. *et al.* Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079-2081 (1998).
  - 30) Rojek, J. M., Spiropoulou, C. F., Campbell, K. P. & Kunz, S. Old World and clade C New World arenaviruses mimic the molecular mechanism of receptor recognition used by alpha-dystroglycan's host-derived ligands. *Journal of virology* **81**, 5685-5695, doi:10.1128/JVI.02574-06 [pii]10.1128/JVI.02574-06 (2007).
  - 31) Radoshitzky, S. R. *et al.* Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**, 92-96, doi:nature05539 [pii]10.1038/nature05539 (2007).
  - 32) Jae, L. T. *et al.* Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science* **344**, 1506-1510, doi:10.1126/science.1252480 (2014).
  - 33) Raaben, M. *et al.* NRP2 and CD63 Are Host Factors for Lujovirus Cell Entry. *Cell Host Microbe* **22**, 688-696 e685, doi:10.1016/j.chom.2017.10.002 (2017).
  - 34) Kunz, S. Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus-host interaction. *Virology* **387**, 245-249, doi:S0042-6822(09)00166-4 [pii]10.1016/j.virol.2009.02.042 (2009).
  - 35) Kunz, S., Borrow, P. & Oldstone, M. B. Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **262**, 111-137 (2002).
  - 36) Hofmann, H. *et al.* Severe fever with thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines. *Journal of virology* **87**, 4384-4394, doi:10.1128/JVI.02628-12 (2013).
  - 37) Sun, Y. *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA is a critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Journal of virology* **88**, 237-248, doi:10.1128/JVI.02141-13 (2014).
  - 38) Liu, J. *et al.* Single-Particle Tracking Reveals the Sequential Entry Process of the Bunyavirus Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *Small* **15**, e1803788, doi:10.1002/smll.201803788 (2019).
  - 39) Tani, H. *et al.* Characterization of Glycoprotein-Mediated Entry of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *Journal of virology* **90**, 5292-5301, doi:10.1128/JVI.00110-16 (2016).
  - 40) Hoenen, T. *et al.* Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *Journal of virology* **86**, 11779-11788, doi:10.1128/JVI.01525-12 (2012).
  - 41) Baird, N. L., York, J. & Nunberg, J. H. Arenavirus infection induces discrete cytosolic structures for RNA replication. *Journal of virology* **86**, 11301-11310, doi:10.1128/JVI.01635-12 (2012).
  - 42) Zhou, Y., Su, J. M., Samuel, C. E. & Ma, D. Measles Virus Forms Inclusion Bodies with Properties of Liquid Organelles. *Journal of virology* **93**, doi:10.1128/JVI.00948-19 (2019).
  - 43) Urata, S., Uno, Y., Kurosaki, Y. & Yasuda, J. The cholesterol, fatty acid and triglyceride synthesis pathways regulated by site 1 protease (S1P) are required for efficient replication of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Biochem Biophys Res Commun* **503**, 631-636, doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.053 (2018).
  - 44) Jasenosky, L. D., Neumann, G., Lukashevich, I. & Kawaoka, Y. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *Journal of virology* **75**, 5205-5214, doi:10.1128/JVI.75.11.5205-5214.2001 (2001).
  - 45) Noda, T. *et al.* Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *Journal of virology* **76**, 4855-4865 (2002).
  - 46) Timmins, J., Scianimanico, S., Schoehn, G. & Weissenhorn, W. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**, 1-6, doi:10.1006/viro.2001.0860S0042-6822(01)90860-8 [pii] (2001).
  - 47) Urata, S., Yokosawa, H. & Yasuda, J. Regulation of HTLV-1 Gag budding by Vps4A, Vps4B, and AIP1/Alix. *Virol J* **4**, 66, doi:1743-422X-4-66 [pii]10.1186/1743-422X-4-66 (2007).
  - 48) Sakurai, A. *et al.* Regulation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) budding by ubiquitin ligase Nedd4. *Microbes Infect* **6**, 150-156, doi:10.1016/j.micinf.2003.10.011S1286457903003149 [pii] (2004).
  - 49) Yasuda, J. & Hunter, E. A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *Journal of virology* **72**, 4095-4103 (1998).
  - 50) Iwasaki, M. *et al.* The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by inter-

- acting with the nucleocapsid protein. *Journal of virology* **83**, 10374-10383, doi:10.1128/JVI.01056-09 (2009).
- 51) Schmitt, A. P., Leser, G. P., Morita, E., Sundquist, W. I. & Lamb, R. A. Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *Journal of virology* **79**, 2988-2997, doi:79/5/2988 [pii]10.1128/JVI.79.5.2988-2997.2005 (2005).
  - 52) Rauch, S. & Martin-Serrano, J. Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *Journal of virology* **85**, 3546-3556, doi:JVI.02045-10 [pii]10.1128/JVI.02045-10 (2011).
  - 53) Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. & Bieniasz, P. D. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**, 89-101, doi:jcb.200408155 [pii]10.1083/jcb.200408155 (2005).
  - 54) Tabata, K. *et al.* Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep* **16**, 2339-2347, doi:10.1016/j.celrep.2016.07.068 (2016).
  - 55) Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905, doi:10.1038/nrm973 (2002).
  - 56) Garrus, J. E. *et al.* Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**, 55-65, doi:S0092-8674(01)00506-2 [pii] (2001).
  - 57) Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D. & Bieniasz, P. D. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12414-12419, doi:10.1073/pnas.21338461002133846100 [pii] (2003).
  - 58) Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908-1912, doi:10.1126/science.1143422 (2007).
  - 59) Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P. & Carlton, J. G. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* **522**, 236-239, doi:10.1038/nature14503 (2015).
  - 60) Vietri, M. *et al.* Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* **522**, 231-235, doi:10.1038/nature14408 (2015).
  - 61) Jimenez, A. J. *et al.* ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* **343**, 1247136, doi:10.1126/science.1247136 (2014).
  - 62) Murrow, L., Malhotra, R. & Debnath, J. ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nat Cell Biol* **17**, 300-310, doi:10.1038/ncb3112 (2015).
  - 63) Vietri, M., Radulovic, M. & Stenmark, H. The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 25-42, doi:10.1038/s41580-019-0177-4 (2020).
  - 64) Neumann, G. *et al.* Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *Journal of virology* **79**, 10300-10307, doi:79/16/10300 [pii] 10.1128/JVI.79.16.10300-10307.2005 (2005).
  - 65) Irie, T., Licata, J. M. & Hartly, R. N. Functional characterization of Ebola virus L-domains using VSV recombinants. *Virology* **336**, 291-298, doi:S0042-6822(05)00182-0 [pii]10.1016/j.virol.2005.03.027 (2005).
  - 66) Licata, J. M. *et al.* Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *Journal of virology* **77**, 1812-1819 (2003).
  - 67) Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**, 1313-1319, doi:10.1038/nm1201-1313nm1201-1313 [pii] (2001).
  - 68) Timmins, J. *et al.* Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* **326**, 493-502, doi:S0022283602014067 [pii] (2003).
  - 69) Han, Z. *et al.* ITCH E3 Ubiquitin Ligase Interacts with Ebola Virus VP40 To Regulate Budding. *Journal of virology* **90**, 9163-9171, doi:10.1128/JVI.01078-16 (2016).
  - 70) Hartly, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huijbregtse, J. & Hayes, F. P. A PPXY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13871-13876, doi:10.1073/pnas.250277297250277297 [pii] (2000).
  - 71) Yasuda, J., Nakao, M., Kawaoka, Y. & Shida, H. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *Journal of virology* **77**, 9987-9992 (2003).
  - 72) Han, Z. *et al.* ALIX Rescues Budding of a Double PTAP/PPEY L-Domain Deletion Mutant of Ebola VP40: A Role for ALIX in Ebola Virus Egress. *J Infect Dis* **212 Suppl 2**, S138-145, doi:10.1093/infdis/jiu838 (2015).
  - 73) Wendt, L., Kamper, L., Schmidt, M. L., Mettenleiter, T. C. & Hoenen, T. Analysis of a Putative Late Domain Using an Ebola Virus Transcription and Replication-Competent Virus-Like Particle System. *J Infect Dis* **218**, S355-S359, doi:10.1093/infdis/jiy247 (2018).
  - 74) Hoenen, T. *et al.* Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *Journal of virology* **84**, 7053-7063, doi:10.1128/JVI.00737-10 (2010).
  - 75) Ruigrok, R. W. *et al.* Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol* **300**, 103-112, doi:10.1006/jmbi.2000.3822 (2000).
  - 76) Bornholdt, Z. A. *et al.* Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell* **154**, 763-774, doi:10.1016/j.cell.2013.07.015 (2013).
  - 77) Adu-Gyamfi, E. *et al.* The Ebola virus matrix protein penetrates into the plasma membrane: a key step in viral protein 40 (VP40) oligomerization and viral egress. *J Biol Chem* **288**, 5779-5789, doi:10.1074/jbc.M112.443960 (2013).

- 78) Del Vecchio, K. *et al.* A cationic, C-terminal patch and structural rearrangements in Ebola virus matrix VP40 protein control its interactions with phosphatidylserine. *J Biol Chem* **293**, 3335-3349, doi:10.1074/jbc.M117.816280 (2018).
- 79) Soni, S. P., Adu-Gyamfi, E., Yong, S. S., Jee, C. S. & Stahelin, R. V. The Ebola virus matrix protein deeply penetrates the plasma membrane: an important step in viral egress. *Biophys J* **104**, 1940-1949, doi:10.1016/j.bpj.2013.03.021 (2013).
- 80) Yamayoshi, S. & Kawaoka, Y. Mapping of a region of Ebola virus VP40 that is important in the production of virus-like particles. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S291-295, doi:10.1086/520595 (2007).
- 81) Yamayoshi, S., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Role of the GTPase Rab1b in ebolavirus particle formation. *Journal of virology* **84**, 4816-4820, doi:JVI.00010-10 [pii]10.1128/JVI.00010-10 (2010).
- 82) Yamayoshi, S. *et al.* Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* **3**, 168-177, doi:S1931-3128(08)00052-8 [pii]10.1016/j.chom.2008.02.001 (2008).
- 83) Urata, S., Ishikawa, T. & Yasuda, J. Roles of YIGL sequence of Ebola virus VP40 on genome replication and particle production. *The Journal of general virology* **100**, 1099-1111, doi:10.1099/jgv.0.001286 (2019).
- 84) Urata, S. *et al.* Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *Journal of virology* **81**, 4895-4899, doi:JVI.02829-06 [pii]10.1128/JVI.02829-06 (2007).
- 85) Urata, S. & Yasuda, J. Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: a different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40. *The Journal of general virology* **91**, 228-234, doi:vir.0.015495-0 [pii]10.1099/vir.0.015495-0 (2010).
- 86) Zaza, A. D., Herbreteau, C. H., Peyrefitte, C. N. & Emonet, S. F. Mammarenaviruses deleted from their Z gene are replicative and produce an infectious progeny in BHK-21 cells. *Virology* **518**, 34-44, doi:10.1016/j.virol.2018.01.013 (2018).
- 87) Urata, S., Yasuda, J. & de la Torre, J. C. The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *Journal of virology* **83**, 12651-12655, doi:JVI.01012-09 [pii]10.1128/JVI.01012-09 (2009).
- 88) Groseth, A., Wolff, S., Strecker, T., Hoenen, T. & Becker, S. Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *Journal of virology* **84**, 3603-3611, doi:JVI.02429-09 [pii]10.1128/JVI.02429-09 (2010).
- 89) Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. & Yasuda, J. Cellular factors required for Lassa virus budding. *Journal of virology* **80**, 4191-4195, doi:80/8/4191 [pii]10.1128/JVI.80.8.4191-4195.2006 (2006).
- 90) Perez, M., Craven, R. C. & de la Torre, J. C. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12978-12983, doi:10.1073/pnas.2133782100 [pii] (2003).
- 91) Urata, S. *et al.* Analysis of Assembly and Budding of Lujo Virus. *Journal of virology* **90**, 3257-3261, doi:10.1128/JVI.03198-15 (2016).
- 92) Urata, S., Ngo, N. & de la Torre, J. C. The PI3K/Akt Pathway Contributes to Arenavirus Budding. *Journal of virology* **86**, 4578-4585, doi:JVI.06604-11 [pii]10.1128/JVI.06604-11 (2012).
- 93) Baz-Martinez, M. *et al.* Regulation of Ebola virus VP40 matrix protein by SUMO. *Scientific reports* **6**, 37258, doi:10.1038/srep37258 (2016).
- 94) Licata, J. M., Johnson, R. F., Han, Z. & Harty, R. N. Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Journal of virology* **78**, 7344-7351, doi:10.1128/JVI.78.14.7344-7351.200478/14/7344 [pii] (2004).
- 95) Dolnik, O., Kolesnikova, L., Stevermann, L. & Becker, S. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *Journal of virology* **84**, 7847-7856, doi:JVI.00476-10 [pii]10.1128/JVI.00476-10 (2010).
- 96) Urata, S. & Yasuda, J. Cis- and cell type-dependent trans-requirements for Lassa virus-like particle production. *The Journal of general virology* **96**, 1626-1635, doi:10.1099/vir.0.000105 (2015).
- 97) Urata, S. *et al.* Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of arenavirus glycoprotein processing by the cellular site 1 protease. *Journal of virology* **85**, 795-803, doi:JVI.02019-10 [pii]10.1128/JVI.02019-10 (2011).
- 98) Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J. C., Gorney, R. & Oldstone, M. B. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* **314**, 168-178, doi:S0042682203004215 [pii] (2003).
- 99) Strandin, T., Hepojoki, J. & Vaheri, A. Cytoplasmic tails of bunyavirus Gn glycoproteins-Could they act as matrix protein surrogates? *Virology* **437**, 73-80, doi:10.1016/j.virol.2013.01.001 (2013).
- 100) Brennan, B., Rezelj, V. V. & Elliott, R. M. Mapping of Transcription Termination within the S Segment of SFTS Phlebovirus Facilitated Generation of NSs Deletant Viruses. *Journal of virology* **91**, doi:10.1128/JVI.00743-17 (2017).
- 101) Rezelj, V. V. *et al.* M Segment-Based Minigenomes and Virus-Like Particle Assays as an Approach To Assess the Potential of Tick-Borne Phlebovirus Genome Reassortment. *Journal of virology* **93**, doi:10.1128/JVI.02068-18 (2019).
- 102) Basler, C. F. *et al.* The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *Journal of virology* **77**, 7945-7956 (2003).
- 103) Basler, C. F. *et al.* The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America* **97**, 12289-12294, doi:10.1073/pnas.220398297220398297 [pii] (2000).
- 104) Feng, Z., Cerveny, M., Yan, Z. & He, B. The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Journal of virology* **81**, 182-192, doi:JVI.01006-06 [pii]10.1128/JVI.01006-06 (2007).
- 105) Basler, C. F. & Amarasinghe, G. K. Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 511-520, doi:10.1089/jir.2009.0076 (2009).
- 106) Zhang, A. P. *et al.* The ebola virus interferon antagonist VP24 directly binds STAT1 and has a novel, pyramidal fold. *PLoS Pathog* **8**, e1002550, doi:10.1371/journal.ppat.1002550 (2012).
- 107) Reid, S. P. *et al.* Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *Journal of virology* **80**, 5156-5167, doi:10.1128/JVI.02349-05 (2006).
- 108) Ortiz-Riano, E., Cheng, B. Y., de la Torre, J. C. & Martinez-Sobrido, L. The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *Journal of virology* **85**, 13038-13048, doi:JVI.05834-11 [pii]10.1128/JVI.05834-11 (2011).
- 109) Ortiz-Riano, E., Cheng, B. Y., de la Torre, J. C. & Martinez-Sobrido, L. Self-association of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein is mediated by its N-terminal region and is not required for its anti-interferon function. *Journal of virology* **86**, 3307-3317, doi:JVI.05503-11 [pii]10.1128/JVI.05503-11 (2012).
- 110) Martinez-Sobrido, L. *et al.* Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* **83**, 11330-11340, doi:JVI.00763-09 [pii]10.1128/JVI.00763-09 (2009).
- 111) Martinez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A. & de la Torre, J. C. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *Journal of virology* **81**, 12696-12703, doi:JVI.00882-07 [pii]10.1128/JVI.00882-07 (2007).
- 112) Martinez-Sobrido, L., Zuniga, E. I., Rosario, D., Garcia-Sastre, A. & de la Torre, J. C. Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* **80**, 9192-9199, doi:80/18/9192 [pii]10.1128/JVI.00555-06 (2006).
- 113) Qi, X. *et al.* Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**, 779-783, doi:nature09605 [pii]10.1038/nature09605 (2010).
- 114) Shao, J. *et al.* Arenaviral Nucleoproteins Suppress PACT-Induced Augmentation of RIG-I Function To Inhibit Type I Interferon Production. *Journal of virology* **92**, doi:10.1128/JVI.00482-18 (2018).
- 115) Pythoud, C. *et al.* Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKK [varepsilon]. *Journal of virology*, doi:JVI.00187-12 [pii]10.1128/JVI.00187-12 (2012).
- 116) Pythoud, C., Rothenberger, S., Martinez-Sobrido, L., de la Torre, J. C. & Kunz, S. Lymphocytic Choriomeningitis Virus Differentially Affects the Virus-Induced Type I Interferon Response and Mitochondrial Apoptosis Mediated by RIG-I/MAVS. *Journal of virology* **89**, 6240-6250, doi:10.1128/JVI.00610-15 (2015).
- 117) Rodrigo, W. W. *et al.* Arenavirus Nucleoproteins Prevent Activation of Nuclear Factor Kappa B. *Journal of virology*, doi:JVI.07240-11 [pii]10.1128/JVI.07240-11 (2012).
- 118) Wang, J., Danzy, S., Kumar, N., Ly, H. & Liang, Y. Biological roles and functional mechanisms of arenavirus Z protein in viral replication. *Journal of virology* **86**, 9794-9801, doi:10.1128/JVI.00385-12 (2012).
- 119) Xing, J., Ly, H. & Liang, Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *Journal of virology* **89**, 2944-2955, doi:10.1128/JVI.03349-14 (2015).
- 120) Moriyama, M. *et al.* Two Conserved Amino Acids within the NSs of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus Are Essential for Anti-interferon Activity. *Journal of virology* **92**, doi:10.1128/JVI.00706-18 (2018).
- 121) Yoshikawa, R., Sakabe, S., Urata, S. & Yasuda, J. Species-Specific Pathogenicity of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Is Determined by Anti-STAT2 Activity of NSs. *Journal of virology* **93**, doi:10.1128/JVI.02226-18 (2019).
- 122) Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430, doi:nature06553 [pii]10.1038/nature06553 (2008).
- 123) Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y. & Yasuda, J. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *Journal of virology* **83**, 2382-2385, doi:JVI.01607-08 [pii]10.1128/JVI.01607-08 (2009).
- 124) Yasuda, J. Ebolavirus Replication and Tetherin/BST-2. *Front Microbiol* **3**, 111, doi:10.3389/fmicb.2012.00111 (2012).
- 125) Sakuma, T., Sakurai, A. & Yasuda, J. Dimerization of tetherin is not essential for its antiviral activity against Lassa and Marburg viruses. *PLoS One* **4**, e6934, doi:10.1371/journal.pone.0006934 (2009).
- 126) Kaletsky, R. L., Francica, J. R., Agrawal-Gamse, C. & Bates, P. Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2886-2891, doi:10.1073/pnas.0811014106 (2009).
- 127) Lopez, L. A. *et al.* Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal. *Journal of virology* **84**, 7243-7255, doi:10.1128/JVI.02636-09 (2010).
- 128) Kuhl, A. *et al.* The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin. *J Infect Dis* **204** Suppl 3,

- S850-860, doi:10.1093/infdis/jir378 (2011).
- 129) Lopez, L. A. *et al.* Anti-tetherin activities of HIV-1 Vpu and Ebola virus glycoprotein do not involve removal of tetherin from lipid rafts. *Journal of virology* **86**, 5467-5480, doi:10.1128/JVI.06280-11 (2012).
- 130) Zadeh R. V., U. S., Sakaguchi M., Yasuda J. Human BST-2/tetherin inhibits Junin virus release from host cells and its inhibition is partially counteracted by viral nucleoprotein. *The Journal of general virology in press* (2020).
- 131) Urata, S. *et al.* BST-2 controls T cell proliferation and exhaustion by shaping the early distribution of a persistent viral infection. *PLoS Pathog* **14**, e1007172, doi:10.1371/journal.ppat.1007172 (2018).
- 132) Ollmann Saphire, E. A Vaccine against Ebola Virus. *Cell* **181**, 6, doi:10.1016/j.cell.2020.03.011 (2020).
- 133) Callaway, E. 'Make Ebola a thing of the past': first vaccine against deadly virus approved. *Nature* **575**, 425-426, doi:10.1038/d41586-019-03490-8 (2019).
- 134) Marzi, A. *et al.* Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates. *Science* **348**, 439-442, doi:10.1126/science.aaa4919 (2015).
- 135) Wang, W. *et al.* The Cap-Snatching SFTSV Endonuclease Domain Is an Antiviral Target. *Cell Rep* **30**, 153-163 e155, doi:10.1016/j.celrep.2019.12.020 (2020).
- 136) Reguera, J. *et al.* Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases. *PLoS Pathog* **12**, e1005636, doi:10.1371/journal.ppat.1005636 (2016)

## **Molecular mechanisms of highly pathogenic viruses' replication and their applications for a novel drug discovery**

**Shuzo URATA**

National Research Center for the Control and Prevention of Infectious Diseases (CCPID)/  
Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University

An appearance of many viral emerging infectious diseases, such as Ebola virus disease, Lassa fever, as well as Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS), becomes a huge concern of public health worldwide. Recently, people start to pay attention on these infectious diseases, makes virologists speed up the basic research and also the development of the antivirals against these highly pathogenic viruses. We have focused on the highly pathogenic viruses and tried to understand the replication and propagation mechanisms of these viruses in molecular level, and also aimed to connect these findings to applied medicine to develop novel antivirals.

